

产品说明

Pfu DNA Ligase 来源于嗜热微生物, 以 ATP 为辅酶, 在 45℃~80℃催化双链 DNA 相邻 5'-磷酸和 3'-羟基端的连接。由于具有较高的耐热性, 允许较高的反应温度, 从而提高了 LCR (连接酶链式反应) 的忠实性。Pfu DNA 连接酶比 Taq DNA 连接酶具有更高的连接特异性, 非常适合于检测单核苷酸多态性 (SNP), 例如药物基因组学的基因分型指导用药。

本公司Pfu DNA Ligase是重组表达, 并经多步纯化制备的重组蛋白。

活性定义

在20 μl反应体系中, 45℃条件下, 15分钟内使 50%经BstEII消化的1 μg λ DNA片段 (12 bp 粘性末端, 相当于约 0.0338pmole) 发生连接所需要的酶量, 定义为 1 个活性单位。

活性测定条件

在 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM ATP, 0.1% Tween 20, 0.1 mg/ml BSA 中, 45℃反应 15min。

浓度: 40U/μl

保存条件: -20℃。

特点

- 耐热性好, 兼容 连接酶链式反应 (ligase chain reaction, LCR) 模板预变性步骤;
- 忠实性极高, 缺口处错配碱基对不会被连接
- 可在高温条件下连接 DNA 链上的切刻位点。
- 与常温 DNA 连接酶相比, 具有更高的连接特异性和较低的非特异性背景。
- 与Taq DNA 连接酶相比, 具有更高的连接特异性和较低的非特异性背景。
- 反应温度范围为 40-70℃, 高温下特异性和活性增强, 反应温度可接近 80℃。

适用范围

- 通过连接酶检测反应和连接酶链式反应, 检测等位基因特异性
- 连接酶链式反应 (LCR) 中连接磷酸化寡核苷酸
- 高温下连接 DNA 链上的切刻位点

产品包装规格及组成

Component	AE1307A	AE1307B
Pfu DNA Ligase	2000U	10000U
10×ATP型 DNA Ligase Buffer	0.2ml	1.0ml

质量控制

相关测试表明无外源内切、外切脱氧核糖核酸酶、RNase 污染和磷酸酯酶, 满足常规连接反应要求。PCR 方法检测无宿主残余 DNA。

酶贮存缓冲液

20 mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 50% glycerol.

注意事项

- 推荐 DNA 5' 末端浓度为 0.1 μM, 55℃ 温育。
- 高温下特异性和活性增强, 反应温度可接近 80℃, 但注意确保反应温度下dsDNA底物没有变成单链DNA。

相关产品

AE1310: 9°N DNA ligase

应用实例

1. 连接反应

1) 按下表配制反应体系

反应组分	体积/ul
10× Buffer	2
底物：互补粘性末端>8nt 的 DNA	100ng-1μg
pfu DNA ligase (40U/μl)	1-2
H ₂ O	Variable
总体积	20

2) 45-50°C 连接 15min

3) 对于较长的双链 DNA 底物，琼脂糖电泳检测连接产物；对于短于 100bp 的短片段 DNA，聚丙烯酰胺凝胶电泳检测连接产物。

警告：本产品仅限科研实验使用，临床应用安全性和有效性未鉴定，不可用于医疗临床诊断。